

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y TECNOLOGÍA
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS:
**DETERMINACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS A RESISTENCIA
A ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AISLADAS EN EL
HOSPITAL DEL NIÑO DE LA REPÚBLICA DE PANAMÁ**

AUTOR:
HÉCTOR M. SAMBRANO M.

ASESORA:
DRA. MAGALY DE CHIAL

TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR POR EL
TÍTULO DE MAESTRÍA EN CENCIAS BIOLÓGICAS CON ÉNFASIS EN GENÉTICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR

PANAMÁ, REPUBLICA DE PANAMÁ
2018

DEDICATORIA

Por otro lado lo dedico a dos personas, una que físicamente no está con nosotros pero siempre ha sido una inspiración en mi vida, a mi abuelo **ANGEL OCTAVIO MUÑOZ** y a mi tío **JAVIER TEJEIRA** quien ha sido un pilar fundamental en mi formación académica y personal.

AGRADECIMIENTO

Agradezco primeramente a Dios Todopoderoso, por haberme dado la sabiduría y fuerza necesaria para culminar exitosamente esta Maestría.

Agradezco a cada uno de mis familiares y amigos por haberme apoyado a lo largo de este proyecto académico.

Por otro lado a mis compañeros y asesores por todo el apoyo brindado, muy en especial a la Dra. **MAGALY DE CHIAL** quien me guio en todo momento y me brindó todo su tiempo y conocimiento para lograr este objetivo.

Al Lic. **Oswaldo Cisternas**, Jefe de Microbiología del Hospital del Niño por todo el apoyo brindado en cuanto a la obtención de las muestras que se utilizaron para llevar a cabo este trabajo.

INDICE GENERAL

Resumen	1
Summary	1
Introducción	2
1. Revisión literaria	4
a. Infecciones nosocomiales	4
i. Definición	4
b. Resistencia bacteriana	6
c. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
i. Generalidades	7
ii. Resistencia de <i>P. aeruginosa</i>	8
iii. Genes de β -lactamasas	10
iv. Genes <i>mexA</i> , <i>mexB</i> y <i>mexR</i>	12
v. Genes <i>FpvA</i>	14
2. Aspectos metodológicos	16
a. Prueba de concentración inhibitoria (MIC)	16
b. Cultivo y aislamiento de cepas de <i>P. aeruginosa</i>	17
c. Extracción de ADN de las cepas de <i>P. aeruginosa</i>	17
d. Amplificación de secuencias de genes de β -lactamasas <i>SHV</i> , <i>CTX-M</i> y <i>TEM</i>	18
e. Amplificación de secuencias de genes <i>FpvA</i>	19
f. Amplificación de secuencias de genes <i>mexA</i> , <i>mexB</i> y <i>mexR</i>	20
3. Resultados y discusión	21
a. Prueba de concentración inhibitoria (MIC)	21
b. Amplificación de secuencias de genes de β -lactamasas <i>SHV</i> , <i>CTX-M</i> y <i>TEM</i>	23
c. Genes <i>FpvAI</i> , <i>FpvAII</i> y <i>FpvAIII</i>	25
d. Genes <i>mexA</i> , <i>mexB</i> y <i>mexR</i>	28
4. Conclusión y Recomendaciones	30
a. Conclusión	30
b. Recomendaciones	
5. Bibliografía	32
Anexos	40

RESÚMEN

Determinación de marcadores moleculares asociados a resistencia a antibióticos en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en el Hospital del Niño de la República de Panamá.

Para el estudio de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* se utilizaron 54 muestras suministradas por el Laboratorio de Microbiología del Hospital del Niño. Contamos con 20 cepas resistentes a más de dos antibióticos (consideramos los intermediarios como resistentes). Los análisis del MIC se llevaron a cabo en el Hospital del Niño y la genotipificación de los marcadores moleculares en la Universidad de Panamá. El 48% de las cepas estudiadas presentaron resistencia a piperaciclina, 16% a imipenem y meropenem. El gen *TEM* fue detectado por PCR en 22 de las cepas estudiadas, mientras que el gen *CTX-M* en una cepa. No se detectó en ninguna cepa el gen *SHV*. De los receptores de pioverdina el más frecuente fue el tipo *FpvAIII*. De la bomba de eflujo el 73% de las cepas presentaron los 3 genes estudiados (*mexA*, *mexB* y *mexR*). Se observaron cepas que donde no se detectó todos los genes, así que, podríamos decir que tienen otro mecanismo de resistencia que no es a través de estas bombas, ya que no sería funcional.

SUMMARY

Determination of molecular markers associated to antibiotics to resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Hospital del Niño de la República de Panamá.

For the study of the strains of *Pseudomonas aeruginosa*, 54 samples were used, supplied by the Laboratory of Microbiology of the Hospital del Niño. We have 20 strains resistant to more than two antibiotics (we consider intermediates as resistant). The MIC analyzes were carried out at the Hospital del Niño. Genotyping of molecular markers at the University of Panama. 48% of the strains studied showed resistance to piperacycline, 16% to imipenem and meropenem. The *TEM* gene was detected by PCR in 22 of the strains studied, while of the gene *CTX-M* only one strain amplified and none of the *SHV*. Of the pioverdin receptors, the most frequent type was *FpvAIII*. From the efflux pump, 73% of the strains showed the 3 genes studied (*mexA*, *mexB* and *mexR*). In the strains that did not present the complete genes we could say that they have another mechanism of resistance that is not through these pumps, because they are not Functional.

INTRODUCCIÓN

Tanto los genes que codifican enzimas betalactámicas como los mexA-B-R y FpvA, tienen funciones diferentes, pero están relacionados a algún modo de la acción antimicrobiana de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y de su virulencia.

La infección nosocomial es conocida como la que se adquiere durante la hospitalización manifestándose tanto en el hospital como después del egreso del paciente (Sánchez, 2008). Se incluye las infecciones ocupacionales del personal del establecimiento, hasta después de 48 horas de estar en el establecimiento de salud (OMS, 2003). Estas infecciones tienen un curso fulminante y una letalidad extremadamente alta (Luján *et al.*, 2008), y se presentan una de las preocupaciones de salud más importantes a nivel mundial (Sánchez, 2008).

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria de origen ambiental que puede estar presente en suelo, agua u organismos superiores (Adesoji *et al.*, 2015) y en vegetales (Allydice y Brown, 2012). Considerada un patógeno esencialmente oportunista (Poole, 2001), infectan pacientes hospitalizados e inmunosuprimidos (Luna *et al.*, 2012, Bahmani *et al.*, 2013), con altas tasas de morbilidad y mortalidad (Villa *et al.*, 2013). Existen reportes que indican que también puede infectar personas saludables (Allydice y Brown, 2012). El tratamiento de las infecciones nosocomiales causadas por estas cepas es actualmente un verdadero desafío terapéutico debido a los múltiples mecanismos de resistencia presentes en este agente patógeno (Yayan *et al.*, 2015; Santella *et al.*, 2011). Entre los principales mecanismos se encuentran las bombas de eflujo, la síntesis de β -lactamasa Amp-C cromosómica, mutación de las topoisomerasas

II y IV, reducción de los canales de porinas y formación de biofilms (Allydice y Brown, 2012; Villa *et al.*, 2013).

Este trabajo está dividido en 4 secciones de acuerdo con el formato para la tesis establecido por la Universidad de Panamá.

La sección 1 es la revisión bibliográfica, en la cual hago un compendio de las diferentes referencias bibliográficas consultadas donde se explican conceptos del problema a estudiar.

En la sección 2 están los aspectos metodológicos, donde se plasman las metodologías, protocolos y equipos utilizados para el desarrollo de este trabajo. En esta misma sección se describe las muestras utilizadas en el trabajo y los laboratorios utilizados.

La sección 3 presento los resultados encontrados en mi estudio y procedo a realizar la discusión de los resultados comparándolos con otros trabajos consultados para evidenciar similitudes o diferencias.

La sección 4 se presenta las conclusiones, recomendaciones y sugerencias de esta investigación y que podrán servir de referencia para estudios posteriores, relacionados a este tema.

El objetivo general de este estudio se basa en determinar los marcadores moleculares asociados a resistencia a antibióticos en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en el Hospital del Niño de la república de Panamá.

Mientras que los específicos: (i) Determinar la presencia de genes de resistencia β -lactámicos (*SHV*, *CTX-M* y *TEM*) en cepas de *P. aeruginosa* aisladas en el Hospital del Niño, (ii) determinar la presencia de los genes de la bomba de eflujo *mexA*, *mexB* y *mexR* en cepas de *P. aeruginosa* y (iii) Determinar la presencia de los genes de receptores de pioverdina, *FpvAI*, *II* y *III* en cepas de *P. aeruginosa*.

1. REVISIÓN DE LA LITERATURA

a. Infecciones nosocomiales

I. Definición

La infección nosocomial es conocida como la adquirida durante la hospitalización manifestándose tanto en el hospital como después del egreso del paciente (Sánchez, 2008) y también las infecciones ocupacionales del personal del establecimiento (OMS, 2003), hasta después de 48-72 horas de estar dentro del establecimiento de salud (Blanco, 2006; Zaragoza *et al*, 2014). Teniendo un curso fulminante y una letalidad extremadamente alta (Luján *et al.*, 2008), siguen siendo una de las preocupaciones de salud más importantes en Latinoamérica y el mundo (Sánchez, 2008).

Dentro de los factores que influyen en la manifestación de este tipo de infecciones tenemos:

- **El agente microbiano**
- **Vulnerabilidad de los pacientes**
- **Factores ambientales**
- **Resistencia microbiana** (Servicio Madrileño de Salud, 2008).

Según los reportes de Olaechea *et al.* (2010), los patógenos de forma individual, en el informe del año 2012, el primer lugar lo ocupa *Pseudomonas aeruginosa* (14,5%), seguido de *Escherichia coli* (13,5%), *Enterococcus faecalis* (7,9%), *Staphylococcus epidermidis* (5,9%), *Klebsiella*

pneumoniae (7,5%) y, en sexto lugar, *Candida albicans* (5,1%), tal cual lo describe el cuadro 1.

Cuadro 1. Microorganismos aislados en las principales infecciones nosocomiales (McMichael, 2013).

Agente	%
<i>S. aureus</i>	16
<i>Enterococcus spp</i>	14.4
<i>E. coli</i>	12
<i>Staphylococcus coagulasa neg</i>	11
<i>K. pneumoniae</i> y <i>K. oxytoca</i>	8
<i>P. aeruginosa</i>	8
<i>Enterobacter spp</i>	5

Las infecciones nosocomiales ocurren en todo el mundo y afectan a los países desarrollados y a los carentes de recursos. Una encuesta de prevalencia realizada bajo los auspicios de la OMS en 55 hospitales de 14 países representativos de 4 Regiones de la OMS (a saber, Europa, el Mediterráneo Oriental, el Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental) mostró que un promedio de 8,7% de los pacientes hospitalizados presentaba infecciones nosocomiales (Health Canada, 1997a). Se estima que, más de 1,4 millones de personas alrededor del mundo sufren complicaciones por infecciones contraídas en el hospital. La máxima frecuencia de infecciones nosocomiales fue notificada por hospitales de las Regiones del Mediterráneo Oriental y de Asia Sudoriental (11,8 y 10,0%, respectivamente), con una prevalencia de 7,7 y de 9,0%, respectivamente, en las Regiones de Europa y del Pacífico Occidental (Health Canada, 1997b).

Las infecciones nosocomiales más frecuentes son las de heridas quirúrgicas, vías urinarias y vías respiratorias inferiores. En el estudio de la

OMS (2003), se ha demostrado también que la máxima prevalencia de infecciones nosocomiales ocurre en unidades de cuidados intensivos, donde la infección más prevalente en cuidados críticos, según los datos del estudio, fue la infección pulmonar (64,7%), seguida de la infección del tracto urinario (17,6%) y de la bacteriemia (12%) (Zaragoza *et al.*, 2014).

En Panamá, entre las décadas 70 y 80 del siglo pasado hubo una movilización profesional sobre el tema de resistencia bacteriana y uso racional de los antibióticos; sin embargo; en los años siguientes el tema perdió importancia y desapareció de las investigaciones en salud, pero en el 2015, el Instituto Conmemorativo Gorgas y Estudios de la Salud (I.C.G.E.S.), la Universidad Latina de Panamá, la Caja de Seguro Social (C.S.S.) y el Ministerio de Salud (M.I.N.S.A.) desarrollaron un trabajo investigativo denominado: “Estudio sobre resistencia bacteriana y uso racional de antibióticos en Panamá” (ANÓNIMO), el cual concluyó que de los 34 hospitales del sector público (C.S.S. y M.I.N.S.A.), el 38% (23 hospitales) cuentan con un comité de infecciones asociadas a la salud, el 43% no realizaban estudios de prevalencia o incidencia y el 96% confirmaron la existencia de resistencia bacteriana en sus instituciones de salud.

b. Resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana se ha constituido uno de los problemas mayores de la medicina en el Siglo XXI, cuyos orígenes datan inclusive para los años 50 de la pasada centuria y que a lo largo de la historia de la humanidad ha representado desafíos para los diferentes países y organizaciones relacionadas con la salud. Así vemos que ha sido definida

como “el fenómeno por el cual un microorganismo deja de ser afectado por un antimicrobiano al que anteriormente era sensible”. (OMSa).

La génesis de la resistencia bacteriana es multifactorial, a finales del siglo XIX se mencionaba que el surgimiento de la resistencia estaba asociado al contacto de la bacteria a concentraciones subletales de antibióticos, y a mediados del siglo 20 se sabía que la resistencia surgía con mayor frecuencia en aquellos pacientes que eran tratados, con antibióticos, de forma ineficiente (OMSb).

c. *Pseudomonas aeruginosa*

i. Generalidades

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo gram negativo, anaeróbico obligado (Bokaeian *et al.*, 2015; Díaz *et al.*, 2012) que puede estar presente en suelo, agua, organismos superiores (Adesoji *et al.*, 2015) y en vegetales (Allydice y Brown, 2012). Su movilidad le ha permitido invadir preferiblemente el tracto respiratorio y las vías urinarias (Casellas, 2011). Considerada un patógeno esencialmente oportunista (Poole, 2001), infectando pacientes hospitalizados e inmunosuprimidos (Luna *et al.*, 2012), con altas tasas de morbilidad y mortalidad (Villa *et al.*, 2013). Existen reportes que indican que también puede infectar personas saludables (Allydice y Brown, 2012).

Según Allydice y Brown (2012) hay evidencias que sugieren que no hay mayor diferencia en virulencia entre cepas aisladas de muestras clínicas o ambientales, como por ejemplo los clones y distribución del pili (Romling *et al.*, 1994), genes de pili (Spangenberg *et al.*, 1995), genes de flagelina (Morgan *et al.*, 1999), genes de eflujo de multidroga y el sistema de

secreción tipo III, el gen de porina *oprD* (Pirnay *et al*, 2002), actividad haemolítica y proteolítica e invasión de células epiteliales (Alonso *et al*, 1999).

El diagnóstico de *P. aeruginosa* se realiza usualmente a través de técnicas de tipificación fenotípica como el API 20E (Biomerieux, Bruselas, Bélgica), por su perfil de sensibilidad a los antibióticos y mediante pruebas de serotipaje entre otras (Díaz *et al.*, 2012). Existen otras especies de *Pseudomonas* que pueden interferir con la tipificación fenotípica ya que están muy relacionadas y esto puede traer errores al diagnosticar este tipo de patógenos (Stehling *et al.*, 2010). Las técnicas de tipificación molecular son altamente específicas y son útiles para diferenciar cepas de pacientes con infecciones crónicas en donde el fenotipo bacteriano es variable (Speert *et al.*, 2002). Secuencias de ADNr 16S han sido utilizadas satisfactoriamente para el diagnóstico molecular de éstas cepas, según Hernández *et al.*, (2016); sin embargo la tipificación de *P. aeruginosa* multiresistente utilizando genes *oprI* y *oprL* han dado mejor resultado según diferentes estudios (Hernández *et al.*, 2016; De Vos *et al.*, 1997).

ii. Resistencia de *P. aeruginosa*

El tratamiento de las infecciones nosocomiales causadas por cepas de esta bacteria, es actualmente un verdadero desafío terapéutico debido a los múltiples mecanismos de resistencia presentes en este agente patógeno (Yayan *et al.*, 2015; Santella *et al.*, 2011). Según Acar (1985), el acceso de los antimicrobianos al sitio diana, PBS, como consecuencia de sus múltiples mecanismos de resistencia, pudiendo afectar hasta el 38% de los pacientes con neumonía debido a *P. aeruginosa* tratados. Por otro lado,

esta bacteria exhibe las tasas más elevadas de resistencia fluoroquinolonas entre un 20% y 35% (según el cuadro 2) presentado por Lister (2009) en su estudio. De igual manera, esta bacteria es considerada un problema de salud pública para pacientes con fibrosis quística (Lyczak, *et al.*, 2002). En Panamá, esta bacteria es la segunda con mayor resistencia a los antimicrobianos, con un 40% para los betalactámicos (ANÓNIMO).

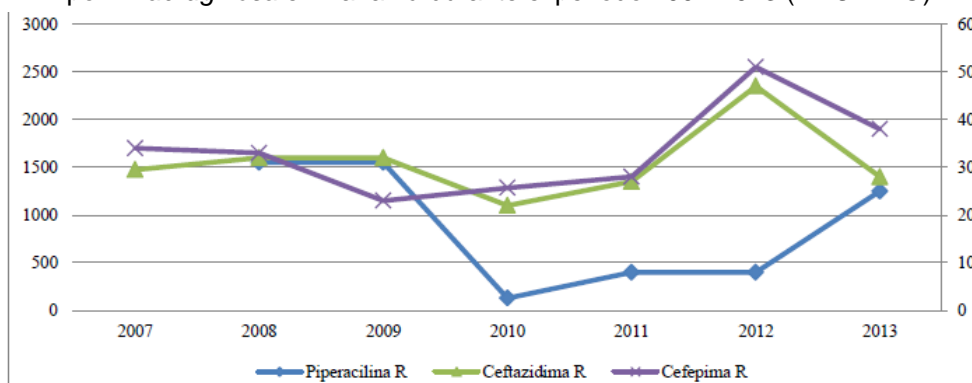
Cuadro 2. Tasa de resistencia antibacterial entre aislados de *P. aeruginosa* de hospitales y unidades de cuidados intensivos (Lister, 2009).

Antibiotic	% of strains exhibiting resistance ^a							
	Hospital study, 2006 (n = 606) (211)	Hospital study, 2005 (n = 589) (212)	Hospital study, 2002 (n = 9,896) (54)	ICU study, 2002 (n = 951) (178)	ICU study, 2000-2002 (n = 7,500) (95)	Hospital study, 2001 (n = 2,157) (99)	ICU study, 2001 (n = 543) (99)	Hospital study, 2000 (n = 882) (100)
β-Lactams								
Cefepime	6	5	9	25	12	8	10	9
Ceftazidime	13	10	13	19	17	9	9	13
Piperacillin-tazobactam	11	9	11	10	14	8	8	13
Aztreonam		12		32				
Imipenem	11	7	16	23	22	12	16	16
Meropenem	6	7			18	11	16	10
Fluoroquinolones								
Ciprofloxacin	21	22	35	32	33	26	25	25
Levofloxacin	22	22		34	32	27	25	27
Aminoglycosides								
Amikacin			5	10		4	3	
Tobramycin	8	10	12	16				
Gentamicin	12	12	16		22	15	15	14

^a Based upon CLSI interpretive breakpoints.

Hasta la fecha existen tres mecanismos de resistencia identificados en *P. aeruginosa*, (1) resistencia intrínseca comprende aquellos mecanismos que exhiben la mayoría de las cepas de esta bacteria, sin considerar la exposición a antibióticos; (2) la resistencia adquirida involucra la inducción de resistencia inestable sin ningún cambio observable en el genotipo por la exposición a antibióticos de las cepas y (3) la resistencia genética involucra la inducción estable de nueva información genética como la mutación de un gen o mecanismo de control ó a través de la adquisición de un plásmido resistente a drogas (Hancock, 1998).

Gráfica 1. Comportamiento de la resistencia a los antimicrobianos betalactámicos por *P. aeruginosa* en Panamá durante el periodo 2007-2013 (ANÓNIMO).



Entre los principales mecanismos se encuentran las bombas de eflujo, la síntesis de β -lactamasa cromosómica, mutación de las topoisomerasas II y IV, reducción de los canales de porinas, formación de biofilms (Bonomo y Szabo, 2006; Allydice y Brown, 2012; Díaz *et al.*, 2012; Villa *et al.*, 2013).

iii. Genes de β -lactamasas

Los agentes antimicrobiales betalactámicos exhiben el tratamiento más común frente a infecciones bacteriales, principalmente de gram negativas. La persistente exposición de éstas bacterias frente a los antibióticos betalactámicos han inducido una dinámica y constante producción de mutaciones en genes de las enzimas β -lactamasas, expandiendo su actividad resistente a los nuevos antibióticos beta lactámicos producidos en el mundo (Shaikh ket al., 2015). Las β -lactamasas son enzimas, producidas por *Bacillus* gram negativos y por algunos hongos, utilizadas para defenderse de antibióticos betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas) (Kaur y Aggarwal, 2013; Abarca et al., 2001). Las betalactamasas rompen el puente amida del anillo betalactámico, con lo que el antibacteriano no

puede unirse a las proteínas ligadoras a penicilina (PBP), y no se produce el impedimento de la síntesis de la pared celular (Casellas, 2011).

P. aeruginosa, ha sido descrita por la producción de β -lactamasas (Senda et al., 1995) para impedir la inhibición del crecimiento de esta bacteria. La primera β -lactamasa fue identificada en *Escherichia coli* (Abraham, 1940). La era de la penicilina trajo consigo la emergencia de la resistencia en cepas de *Staphylococcus aureus* (Bradford, 2001). Este fenómeno de resistencia se dio por la presión selectiva que ejerce la producción de β -lactámicos por organismos del suelo (Ghuysen et al, 1991).

Según los trabajos de Kaur y Aggarwal (2013) y Morejón, (2013), la primera β -lactamasa mediada por plásmido en bacterias gram negativas fue **TEM-1** descrita en 1960. Fue descubierta en una cepa de *E. coli* en un paciente en Grecia llamado Temoniera, de ahí su nombre (Medeiros, 1984). Siendo mediada por plásmido y transposones, ha sido descubierta en un amplio rango de especies de bacterias en todo el mundo en familias como *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria gonorrhoeae* (Bradford, 2001). Es responsable del 90% de las resistencia a ampicilina en cepas de *E. coli* y de ampicilina y penicilina en cepas de *H. influenzae* y *N. gonorrhoeae* (Barthélemy, et al., 1985 y Livermore, 1985).

Sulphidryl variable (Shakibaie et al., 2008), **SHV** fue la segunda β -lactamasa mediada por plásmido y en otros casos codificada cromosómicamente descrita en cepas de *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella pneumoniae* and *E.coli* (Kaur y Aggarwal, 2013; Bradford, 2001). Es

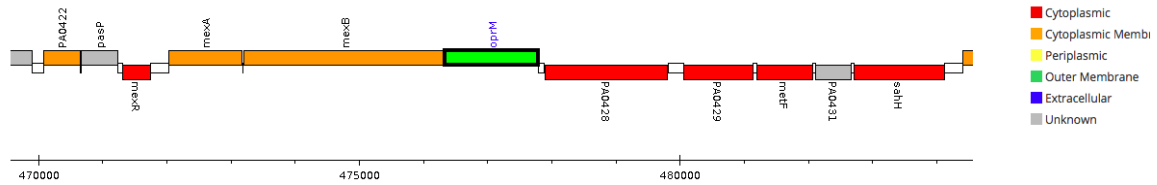
mayormente encontrada en *K. pneumoniae*, siendo responsable de más del 20% de la resistencia a ampicilina y de cefalosporinas de 3ra generación (Morejón, 2013).

La enzima **CTX-M** (denominado así por su actividad hidrolítica frente cefotaximina) (Smet *et al.*, 2009) es de una familia de β -lactamasa diferente, a la de TEM y SHV, y han sido recientemente descritas y hay aproximadamente 65 diferentes formas alélicas de esta β -lactamasa debido a la elevada mutacional en las secuencias plasmídicas que la codifican en especies como *E. coli* (primera especie donde se describió), en especies del género *Kluyvera* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Ishii *et al.*, 1995; Tzouvelekis *et al.*, 2000; Bradford, 2001; Morejón, 2013) Responsables de resistencia frente a cefalosporinas y ampicilinas (Bauernfeind *et al.*, 1996; Bonnet, *et al.*, 1999).

iv. Genes *MexABR-OprM*

Las cepas de *P. aeruginosa* expresan un complejo proteínico que funciona como una bomba de eflujo que lleva las moléculas de antibióticos fuera de la célula del patógeno (Abbas *et al.*, 2018). Este sistema de eflujo está compuesto por tres subunidades proteínicas que son mexA, mexB y oprM codificadas por genes cromosómicos, que funcionan como operones de esta bacteria (así como lo describe la figura 1) (Ghadbman *et al.*, 2012; Lister *et al.*, 2009; Dumas *et al.*, 2005). A parte de esta bomba existen otras bombas de eflujo que pueden estar presentes en estas bacteria, pero han sido menos descritas; MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM, MexJK-OprM, y MexVW-OprM (Adewoye *et al.*, 2002; Kriengkauykiat *et al.*, 2005).

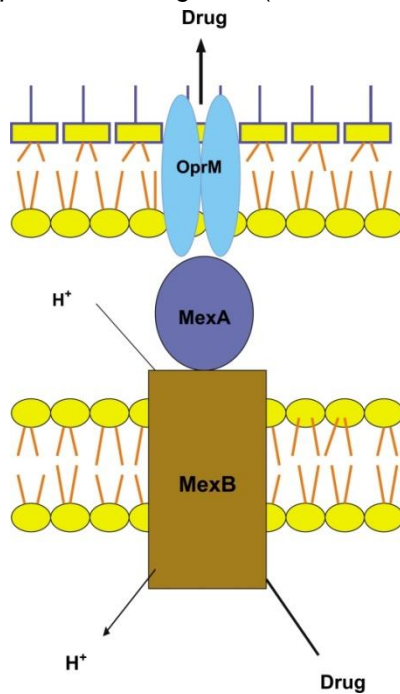
Figura 1. Descripción del complejo *MexAB-OprM* de *P. aeruginosa* (<http://www.pseudomonas.com/feature/show?id=103591>).



MexA-B-OprM, confiere resistencia a antibióticos como fluoroquinolonas, β -lactámicos, tetraciclina, macrólidos, cloramfenicol, novobiocinas, trimetoprim y sulfonamidas (Strateva y Yordanov, 2009; Kohler *et al.*, 1996). Es un complejo protéico fusionado a la membrana bacteriana, con subunidades en ambas membranas y en el espacio periplásmico (así como lo muestra la figura 2) y tiene una particular importancia ya que es un sistema expresado constitutivamente (Adewoye *et al.*, 2002; Ghadibman *et al.*, 2012) y puede ser hipereexpresado si muta el gen *mex-R* (Poole *et al.*, 1996; Srikumar *et al.*, 2000). El producto de la expresión del gen *mex-R*, es un represor negativo de la bomba *mexA-B-OprM* (Poole *et al.*, 2001; Poole *et al.*, 1996).

Según la figura 2, la subunidad *mexA* es una proteína puente que une a *mexB* y *OprM* (Adewoye *et al.*, 2012). La subunidad *mexB* es la proteína que envuelve 12 veces la membrana interna bacteriana y se asume que tiene como función principal el bombeo de los antibióticos, seleccionándolos y exportándolos a través del gradiente de concentración (Akama *et al.*, 2004; Guan *et al.*, 1999). Por otro lado, la subunidad *OprM*, es una lipoproteína que está anclada a la membrana externa de la bacteria y es la encargada de sacar de la membrana externa la molécula de antibiótico (Adewoye *et al.*, 2012).

Figura 2. Modelo del ensamblaje propuesto del complejo MexAB-OprM de *P. aeruginosa* (Askoura *et al.*, 2011).



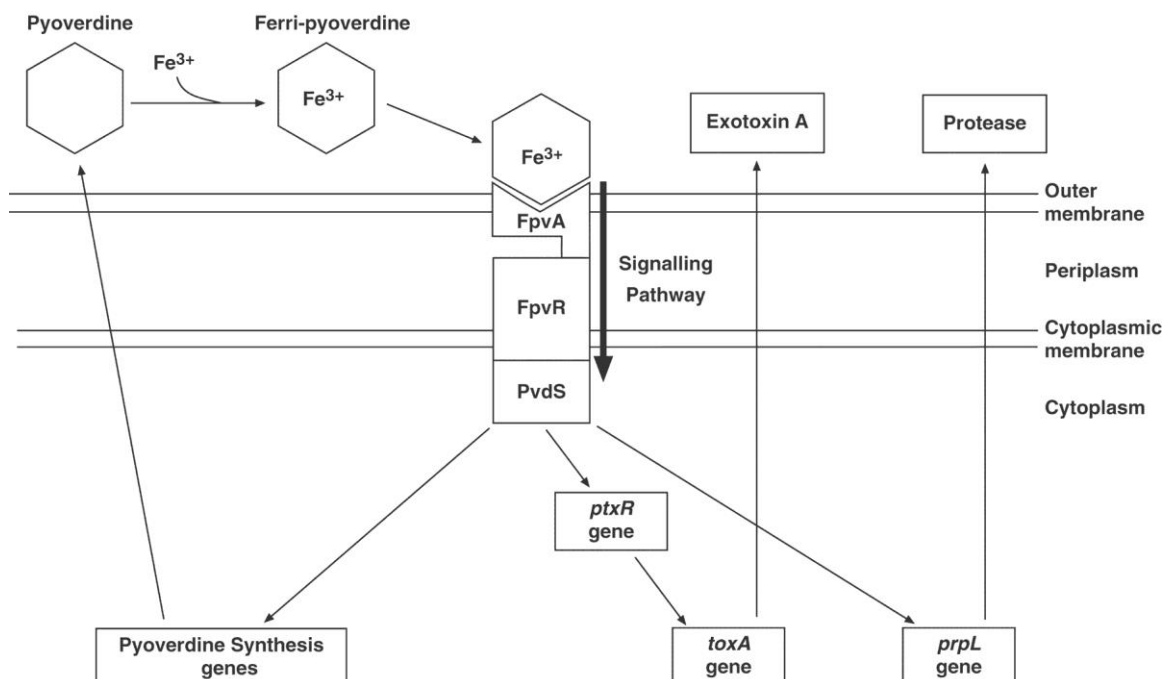
v. Genes *Fpva*

Bajo condiciones mínimas de hierro, *P. aeruginosa*, produce sustancias quelantes (sideróforos) que le permite tener una mayor afinidad por este metal (Sato *et al.*, 2015; Díaz *et al.*, 2012), siendo la pioverdina el principal sideróforo por su elevada afinidad por el ión férrico; Fe^{3+} ; (Cornelis *et al.*, 1989). Esta molécula es la responsable del color verde que emiten las cepas de *P. aeruginosa*, en medios de cultivo de CAA. La pioverdina (tipos: I, II y III) es un factor de virulencia muy importante (ver figura 3) a bajas concentraciones de hierro (Inglis *et al.*, 2016; Bodilis, *et al.*, 2009; Meyer *et al.*, 1997; Litwin *et al.*, 1993). Éste sideróforo interactúa con receptores de la membrana externa llamados FpvA (uno específico para cada tipo de pioverdina) de *P. aeruginosa*, los cuales permiten la entrada de los iones de

hierro y éstos receptores son utilizados para la identificación molecular de cepas de *P. aeruginosa* (de Chial *et al.*, 2003; Pozuelo *et al.*, 2011; Oglesby *et al.*, 2014). Esta virulencia está dada por la producción de exotoxina A, que es una de las toxinas más agresivas de esta bacteria (Cornelis y Dingemans, 2013). Otra estrategia que pueden utilizar algunas cepas de *P. aeruginosa* en bajas concentraciones de hierro es la producción de bombas de eflujo como las MexAB (Ezraty y Barras, 2016).

Es importante señalar que los tres tipos de receptores FpvA son regulados molecularmente por un represor llamado Fur, el cual controla la transcripción de un factor de transcripción extracitoplasmático sigma (ECF) (Cornells y Matthijs, 2002), que dependiendo de la concentración de hierro reprime o no la sobreexpresión de los receptores FpvA (Oglesby *et al.*, 2014).

Figura 3. Modelo de vía de señalización del receptor FpvA con la pioverdina unida al ión férrico (Fe^{3+}). Una vez se une el complejo ferri-pioverdina al receptor FpvA, éste envía señales a otras proteínas para que activen la expresión de genes productores de factores de virulencia (Exotoxina A y proteasas). Lamont, *et al.*, 2002.



2. ASPECTOS METODOLÓGICOS

Para este estudio se utilizaron 54 muestras obtenidas por el personal del Laboratorio de Microbiología del Hospital del Niño. Todas las muestras fueron preservadas en medio de transporte Amies con carbón.

a. Prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

Las muestras fueron tomadas de diferentes partes del cuerpo de pacientes del Hospital del Niño por el personal del Laboratorio de Microbiología. Las muestras se obtuvieron a partir de hemocultivos, urocultivos, catéteres, hisopados oculares, aspirado endotraqueal, secreción bronquial y otros.

A cada muestra se le realizó un análisis de sensibilidad a antibióticos (descritos en el cuadro 3) determinando la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC), mediante el equipo VITEK (bioMérieux). El análisis de sensibilidad fue realizado por Tecnólogos Médicos del Laboratorio de Microbiología del Hospital del Niño.

Cuadro 3. Antibióticos utilizados para realizar el MIC en el VITEK del Hospital del Niño.

Antibiótico	Siglas
Amoxicilina	AMO
Piperaciclina	PIPE
Cefazolina	CEFA
Cefotaxima	CEFO
Ceftriaxona	CEFTRI
Ceftazidima	CEFTA
Cefepime	CEFE
Imipenem	IMI
Meropenem	MERO
Tigeciclina	TIGE
Gentamicina	GENTA
Tobramicina	TOBRA
Trimetoprin	TRI

Nitrofurantoína	NITRO
Ciprofloxacina	CIPRO
Levofloxacina	LEVO
Amikin	AMI
Colistina	COLI
Ampicilina	AMPI
Polimixina b	POLI

b. Cultivo y aislamiento de cepas de *P. aeruginosa*

Las cepas recibidas del Laboratorio de Microbiología del Hospital del Niño, fueron transferidas a platos con agar LB (Luria Bertani) (Denayer *et al.*, 2007) y luego fueron aisladas en medio selectivo de casamino acid (CAA) con el objeto de estimular la producción de pioverdina (Denayer *et al.*, 2007; de Chial *et al.*, 2003; De Vos *et al.*, 1997).

Se utilizó como cepa de referencia ATCC 27553 (Allydice y Brown, 2012; Bodilis *et al.*, 2009) suministrada por el Laboratorio de Microbiología del Hospital del Niño.

c. Extracción de ADN de las cepas de *P. aeruginosa*

La extracción de ADN se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Chen y Kuo (1993), efectivo para la digestión de bacterias gram negativas.

- Se hicieron crecer las cepas *P. aeruginosa* en 5 ml de medio CAA en tubos cónicos de 15 ml durante 24 horas a 37°C con agitación. Se procedió a centrifugar en tubos de 2 ml a 8,000 rpm durante 3 min.
- Se decantó el sobrenadante y se agregaron 200 µl de tampón de lisis y 66 µl de NaCl 5 M. Se procedió a centrifugar a 10,000 rpm por 10 min.
- Se traspasó el sobrenadante a un tubo nuevo de 2 ml y se agregó igual volumen de cloroformo. Se procedió a centrifugar a 10,000 rpm por 10 min.

- El sobrenadante se pasó a otro tubo de 2 ml y se le agregó 2 volúmenes de etanol 100% frío y se dejó toda la noche a -20°C.
- Se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min y se decantó el sobrenadante.
- Se lavó el botón con 300 µl de etanol 70% y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min.
- Se decantó el etanol y se dejó secando cada tubo dentro de la cabina.
- Una vez secas las muestras se procede a eluir con 70 µl de agua desionizada y se almacena a -20°C hasta su uso.

El ADN extraído fue visualizado mediante una corrida electroforética en gel de agarosa de 0.8% (TAE).

d. Amplificación de secuencias de genes de betalactamasas *SHV*, *CTX-M* y *TEM* de las cepas aisladas

Para la amplificación de los genes *SHV*, *CTX-M* y *TEM* se utilizó la metodología descrita por Adesoji *et al.*, (2015) con algunas modificaciones.

Preparación de reactivos

Master mix 2X	10 µl
Cebador forward 10 µM	0.5 µl
Cebador reverse 10 µM	0.5 µl
Agua grado biología molecular	3 µl
ADN templado	1 µl
Volumen final de reacción	15 µl

Programa de amplificación del termociclador

1 min de desnaturalización a de 95 °C, seguido de 30 ciclos de:

96 °C por 30 s (extensión)

55°C por 30 s (anidamiento)

72 °C por 30 s (extensión)

Una extensión final a 72 °C por 10 min.

e. Amplificación de secuencias de genes *Fpval*, *Fpvall* y *Fpvalll* de las cepas aisladas

Para la amplificación de los genes *Fpval*, *Fpvall* y *Fpvalll* utilizamos la metodología descrita por Chial *et al.*, (2003) con ciertas modificaciones.

Preparación de reactivos

Master mix 2X	10 µl
Cebador <i>Fpval</i> forward 10 µM	0.5 µl
Cebador <i>Fpval</i> reverse 10 µM	0.5 µl
Cebador <i>Fpvall</i> forward 10 µM	0.5 µl
Cebador <i>Fpvall</i> reverse 10 µM	0.5 µl
Cebador <i>Fpvalll</i> forward 10 µM	0.5 µl
Cebador <i>Fpvalll</i> reverse 10 µM	0.5 µl
Agua grado biología molecular	1 µl
ADN templado	1 µl
Volumen final de reacción	15 µl

Programa de amplificación del termociclador

3 min de desnaturalización a de 94 °C, seguido de 30 ciclos de:

94 °C por 30 s (extensión)

55°C por 30 s (anidamiento)

72 °C por 30 s (extensión)

Una extensión final a 72 °C por 10 min.

f. Amplificación de secuencias de genes de bomba de eflujo *MexR*, *MexA* y *MexB* de las cepas aisladas

Para la amplificación de los genes *MexR*, *MexA* y *MexB* se utilizó la metodología descrita por Ghadbman *et al.*, (2012) con algunas modificaciones.

Preparación de reactivos

Master mix 2X	12.5 µl
Cebador <i>MexA</i> forward 10 µM	1.5 µl
Cebador <i>MexA</i> reverse 10 µM	1.5 µl
Cebador <i>MexB</i> forward 10 µM	1.5 µl
Cebador <i>MexB</i> reverse 10 µM	1.5 µl
Cebador <i>MexR</i> forward 10 µM	1.5 µl
Cebador <i>MexR</i> reverse 10 µM	1.5 µl
Agua grado biología molecular	2.5 µl
ADN templado	1 µl
Volumen final de reacción	25 µl

Programa de amplificación del termociclador

3 min de desnaturalización a de 94 °C, seguido de 32 ciclos de:

94 °C por 30 s (extensión)

57°C por 45 s (anidamiento)

72 °C por 1 min (extensión)

Una extensión final a 72 °C por 10 min.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a. Prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

Esta prueba se aplicó a las 54 muestras del Hospital del Niño. Las muestras fueron analizadas considerando la resistencia a dos (2) ó más antibióticos y considerando los resultados intermedios como resistentes, así como Luján y colaboradores lo utilizaron en su trabajo publicado en el 2008.

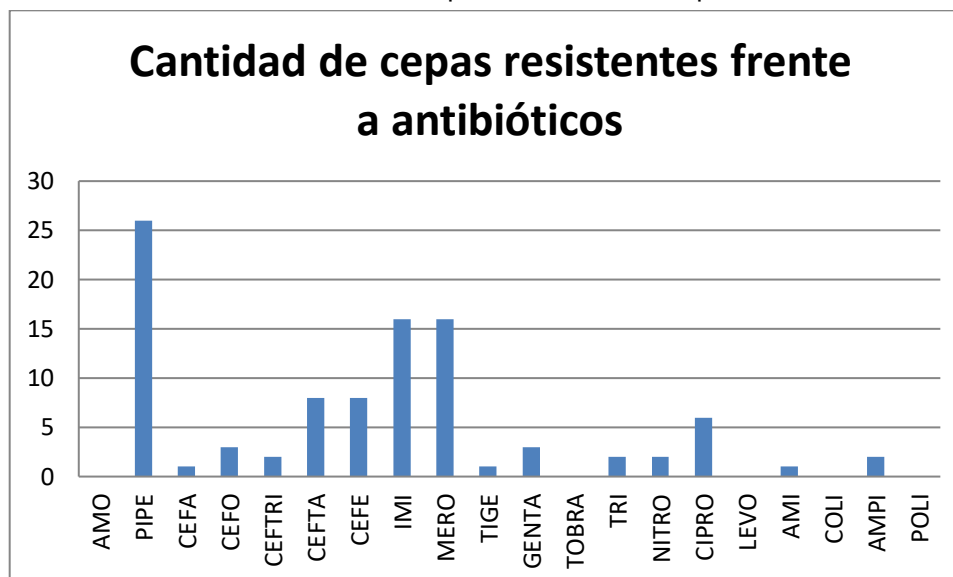
El MIC de las cepas analizadas en nuestro trabajo determinó que de las 54 muestras recibidas por el Hospital del Niño 20 muestras son consideradas resistentes y 34 sensibles a la batería de antibióticos analizados.

Cuadro 4. Cantidad de cepas resistentes, sensibles e intermedias de acuerdo a los resultados del MIC realizado en el Hospital del Niño.

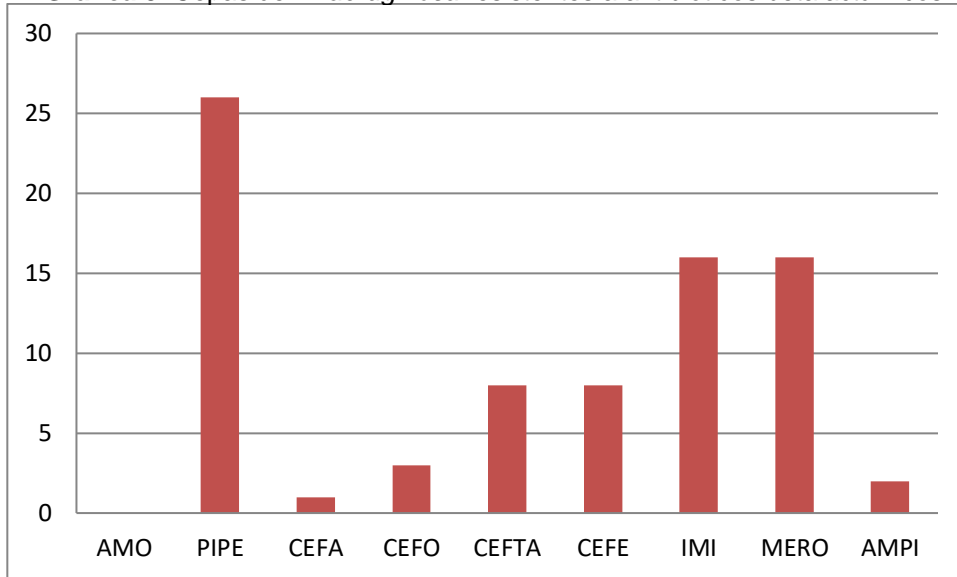
Indicador	Variable	Cantidad
Resistente	R	16
Intermedio	I	4
Sensible	S	34

De los 20 antibióticos analizados por el VITEK, piperaciclina (26), imipenem (16), meropenem (16) fueron los antibióticos que presentaron una mayor resistencia frente a las cepas de *P. aeruginosa* estudiadas, como se muestra en la gráfica 2. Los resultados de Hernández *et al.* (2016), quien analizó 37 cepas de *P. aeruginosa* del Hospital del Niño, obtuvo la mayor resistencia frente a amikin (24%), seguido por imipenem (16%). Cabe señalar que Hernández no evaluó resistencia en piperaciclina, no obstante el porcentaje de cepas resistentes a imipenem en nuestro trabajo es aproximadamente el doble del reportado por Hernández *et al.* (2016)

Gráfica 2. Cantidad de cepas que mostraron resistencia frente a cada uno de los antibióticos analizados por el VITEK del Hospital del Niño.

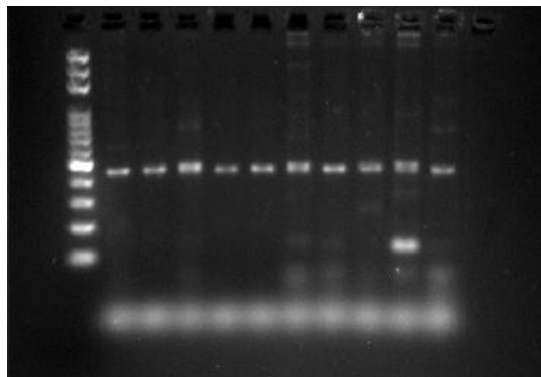


Estos resultados coinciden con los experimentos de Pereira *et al* (2015) y Kaur *et al*, 2013, donde las cepas de *P. aeruginosa* en ambos estudios, presentaron mayor resistencia frente a los antibióticos IMI, PIPE y MERO. Contrarios a los resultados obtenidos por Chen *et al.* (2009) donde cefotaximina obtuvo el 90.1% y piperaciclina tuvo el 69% de resistencia a las cepas de *P. aeruginosa*. En la gráfica 1 (ANÓNIMO, 2015), se muestra el comportamiento de la resistencia de cepas de *P. aeruginosa* (en Panamá) frente a antibióticos betalactámicos y coinciden con nuestros resultados donde colocan la piperaciclina y meropenem como los antibióticos más resistentes, seguido de ceftazidima, cefepima; sin embargo ellos no tomaron en cuenta imipenem y en este estudio sí se tomaron en cuenta, tal cual lo muestra la gráfica 3, donde se separan los antibióticos betalactámicos.

Gráfica 3. Cepas de *P. aeruginosa* resistentes a antibióticos betalactámicos

b. Amplificación de secuencias de genes, SHV, CTX y TEM de las cepas aisladas

No se obtuvo producto de amplificación en ninguna de las 54 cepas para el gen *SHV*. Una cepa generó un producto de amplificación para el gen *CTX-M*, mientras que 22, lo que corresponde al 38%, generaron productos de amplificación para el gen *TEM*, (figura 4).

Figura 4. Amplificación de genes TEM de cepas aisladas de *P. aeruginosa*.

Estos resultados son similares a los obtenidos por Jiang *et al* (2006), en su estudio de 75 cepas clínicas, en el cual no encontró resultados positivos en la amplificación por

PCR de los genes *SHV* ni *CTX-M*, mientras que para el gen *TEM* amplificó 13. Por otro lado Garlich *et al* (2002) analizó 137 cepas de *P. aeruginosa* con una serie de siete (7) cebadores y no obtuvo ningún resultado positivo para los genes *SHV*, *CTX-M* y *TEM*. Adesoji *et al.*, (2015) realizó estudios en 22 cepas de *P. aeruginosa*, donde los resultados también coinciden con los encontrados en nuestro trabajo, para los genes de *SHV*, *CTX-M* y *TEM*, donde obtuvo 4, ninguno y 7 positivos respectivamente. Por otro lado Bonomo y Szabo (2006) indica que estos genes son pocos frecuentes en cepas de *P. aeruginosa*.

Cuadro 5. Este cuadro muestra los resultados de la amplificación por PCR de los genes betalactámicos *SHV*, *CTX-M* y *TEM*.

Muestra	<i>SHV</i>	<i>CTX-M</i>	<i>TEM</i>	Muestra	<i>SHV</i>	<i>CTX-M</i>	<i>TEM</i>
144650	-	-	-	150434	-	-	-
145202	-	-	-	150544	-	-	-
145472	-	-	+	150603	-	-	-
144748	-	-	-	151402	-	-	-
145008	-	-	-	151662	-	-	-
143930	-	-	-	151936	-	+	+
145805	-	-	-	152486	-	-	+
145824	-	-	-	152785	-	-	-
146218	-	-	-	152847	-	-	+
146836	-	-	-	152953	-	-	+
146968	-	-	+	153773	-	-	+
147052	-	-	+	153839	-	-	+
147148	-	-	-	154034	-	-	-
147314	-	-	-	154265	-	-	-
147052	-	-	-	154462	-	-	-
147284	-	-	-	154605	-	-	-
147427	-	-	-	154691	-	-	+
147563	-	-	-	154898	-	-	-
147988	-	-	-	156103	-	-	-
147999	-	-	-	156045	-	-	+
148088	-	-	+	156365	-	-	-
148207	-	-	+	156539	-	-	-
148205	-	-	+	156577	-	-	+
148204	-	-	+	156663	-	-	+
148461	-	-	-	156727	-	-	-

149895	-	-	+	ATCC 27853	-	-	-
149843	-	-	-				
149856	-	-	+				
150080	-	-	-				

Estos resultados y los reportados en otros estudios, sugieren una alta probabilidad que estos genes son de baja frecuencia en la población de *P. aeruginosa*.

c. Genes *Fpval*, *Fpvall* y *Fpvalll*

Los receptores de pioverdina (Fpva) son los encargados del transporte de hierro al interior de la bacteria *P. aeruginosa*, siendo expresados por los genes *Fpval*, *Fpvall* y *Fpvalll*. Estos receptores, en cepas de *P. aeruginosa*, son expresados en medios pobres en hierro como lo es el medio de cultivo CAA (Denayer *et al.*, 2007; de Chial *et al.*, 2003; De Vos *et al.*, 1997), tornándose de un color verde fluorescente en las cepas crecidas indicando la presencia de estos receptores pioverdina, así como lo indica la figura 5. Parecido al resultado de Hernández *et al.* (2016), más del 95% de las cepas de *P. aeruginosa* expresan estos receptores tornando el medio CAA de color verde.

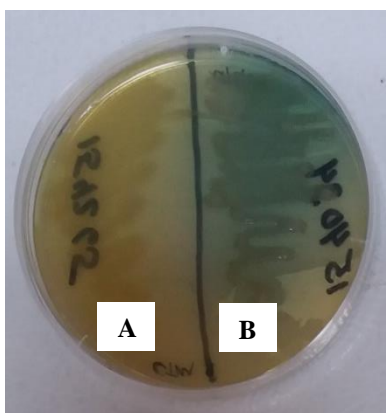


Figura 5. Cepas crecidas en medio CAA. **A.** Muestra una cepa crecida en este medio donde no cambió el color de entorno indicando que no expresa receptores para pioverdina en su membrana. **B.** Muestra una cepa con un color verde en su entorno indicando la presencia de estos receptores en su membrana.

Tal cual lo indica Meyer *et al.* (1997), una cepa de *P. aeruginosa* sólo puede expresar un tipo de receptor de pioverdina a la vez en su membrana, nosotros obtuvimos estos resultados y se muestran el cuadro 6, donde se ve la presencia de un solo tipo de receptor para cada una de las cepas analizadas en nuestro estudio.

Cuadro 6. Presenta los tipos de receptores de pioverdina que expresan cada una de las cepas estudiadas en este estudio.

Muestra	Fpval	Fpvall	Fpvalll	Muestra	Fpval	Fpvall	Fpvalll
144650	X			149856	X		
145202			X	150080	X		
145472	X			150434			X
144748	X			150544	X		
145008	X			150603	X		
145805	X			151402	X		
145824		X		151662			X
146218		X		151936	X		
146836		X		152486	X		
146968	X			152785	X		
147052			X	152847			X
147148			X	152953	X		
147314			X	153773			X
147052			X	153839		X	
147284			X	154034		X	
147427		X		154265			X
147563		X		154462			X
147988		X		154691	X		
147999	X			154898	X		
148088			X	156103			X
148207		X		156045	X		
148205		X		156365	X		
148204	X			156539	X		
148461			X	156727	X		
149895	X			ATCC 27853		X	

Los resultados de esta amplificación lo resume el cuadro 7 y se observan en la figura 6 (gel de agarosa), donde obtuvimos mediante la técnica de PCR que el 100% de las cepas analizadas expresaron receptores de pioverdina y de estas el 48% expresaron el

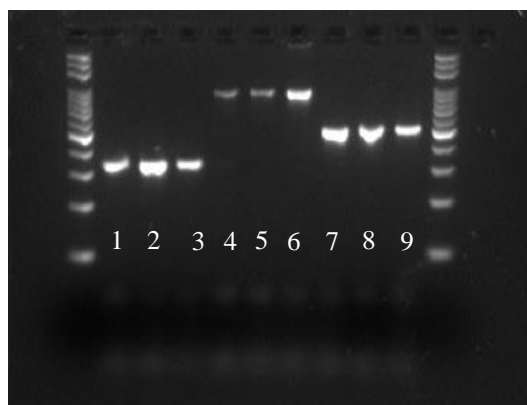
receptor *Fpval*, el 22% expresaron el receptor *Fpvall*, mientras que el 30% expresaron en su membrana el receptor de pioverdina tipo *Fpvalll*.

Cuadro 7. Muestra las cantidades y porcentajes de tipos de receptores *Fpva* expresados en las cepas de *P. aeruginosa* estudiadas aquí.

Gen	No. Positivos	% positivos
<i>Fpval</i>	24	48
<i>Fpvall</i>	11	22
<i>Fpvalll</i>	15	30

Díaz *et al.* (2012), también determinó en su estudio que el alelo más frecuente fue el *Fpval* (45%), *Fpvalll* (38%) y *Fpvall* (17%) en su estudio realizado en la Caja de Seguro Social en Panamá. Diferenciándose del trabajo presentado por de Chial (2003), en su estudio determinó los tres genes de igual manera, pero siendo el alelo tipo *Fpvall* el más frecuente; cabe señalar que en dicho estudio se utilizó menor número de muestras y del trabajo de Pozuelo *et al.* (2011) donde obtuvo presencia de un 89% de alelos tipo II, 3% alelos tipo I y no identificó tipo III. La presencia de clones negativos para la producción de pioverdina se debe a la preferencia en estos pacientes por este tipo de clon y la adquisición de hierro ocurre entonces a través de otro sideróforo de menor afinidad por el hierro que es pioquelina una vez que el receptor está presente (De Vos *et al.*, 2001).

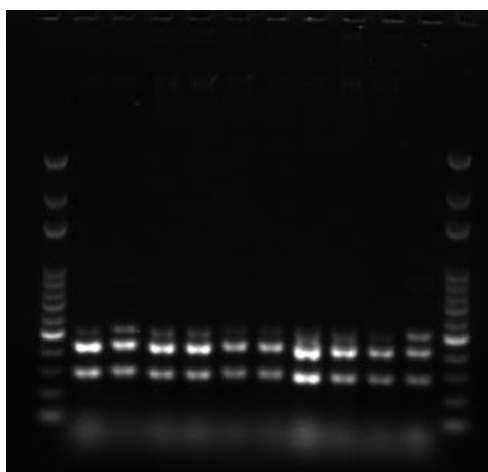
Figura 6. Observamos los genes de *Fpval* (326pb) del carril 1-3, *Fpvall* (897 pb) del carril 4-6 y *Fpvalll* (506 pb) del carril 7-9 en las cepas de *P. aeruginosa* analizadas en este estudio. El marcador de peso molecular fue de 1200 pb.



d. Genes *mexR*, *mexA* y *mexB*

Estos genes funcionan como una bomba de eflujo de moléculas de antibióticos en las cepas de *P. aeruginosa*. En nuestro estudio, la amplificación de estos genes mostró la presencia de fragmentos de 503 pb para el gen *mexA*, 411 pb para *mexR* y 280 pb para *mexB*; así como lo muestra la figura 7. De esta manera, podemos señalar que el gen *mexB* fue el más expresado (94%), seguido por *mexR* (92%) y el gen *mexA* 73%, así lo muestra el cuadro 8 a continuación.

Figura 7. Observamos los genes de *mexA* (503 pb), *mexB* (280 pb) y *mexR* (411 pb) en las cepas de *P. aeruginosa* analizadas en este estudio. El marcador de peso molecular fue de 1200 pb.



De acuerdo a Yoneyama *et al.* (1997), las tres proteínas deben estar presentes para que la bomba de flujo sea funcional y así poder funcionar como un mecanismo de resistencia de la cepa en cuestión. Sin embargo en nuestros resultados vemos que el 100% de nuestras cepas poseen genes *mex*. Arabestani *et al.* (2015), reportó esta baja expresión del gen *mexA* asumiendo que estas cepas utilizan otro mecanismo de resistencia alternativo a la bomba de eflujo. Por otro lado, Jafari *et al.* (2017), reportó en su estudio la presencia de *mexA* en 43 cepas mientras el gen *mexB* se expresó en 41 (total

de las cepas colectadas 50). En este trabajo 12 cepas no amplificaron para el gen *mexA*.

Cuadro 8. Número de genes amplificados *mexAB* y *R* en las cepas de *P. aeruginosa* analizadas.

Gen	No. Positivos	% positivos
<i>mexA</i>	38	73
<i>mexB</i>	49	94
<i>mexR</i>	48	92

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

a. Conclusiones

- ✓ Las infecciones nosocomiales son un problema en la salud pública mundial.
- ✓ Los antibióticos betalactámicos que presentaron mayor resistencia frente a las cepas de *P. aeruginosa* fueron la piperaciclina (26%), seguido por imipenem y meropenem con 16% (cada una) de cepas resistentes a betalactámicos.
- ✓ Los genes que expresan enzimas betalactamasas SHV y CTX-M fueron nada frecuentes entre las cepas analizadas, mientras que el gen que expresa TEM tuvo alta frecuencia en nuestro estudio.
- ✓ El 95% de las cepas analizadas fueron capaces de tornar el medio CAA de color verde, lo que indica que expresan el receptor Fpva (I, II y III) y así lo confirmó la PCR realizada a todas las 50 cepas estudiadas.
- ✓ Los genes de la bomba de flujo mexAB-R completa fue expresada en 38 cepas, siendo el gen mexA (73%) el menos expresado mientras que el gen mexB el más expresado (94%), seguido del gen mexR (92%) en las cepas analizadas.

b. Recomendaciones

- ✓ Este estudio deja sentada las bases para realizar un sin número de investigaciones que lleven a estudiar mejor los diferentes genes involucrados en los mecanismos de resistencia de estas cepas.

- ✓ Ampliar el número de muestras de cepas resistentes y aumentar los establecimientos de salud para evaluar y comparar datos de resistencia frente a los antibióticos utilizados en estos establecimientos.
- ✓ Analizar otros tipos de genes que expresan enzimas betalactámicas que puedan tener mayor frecuencia de expresión entre cepas de *P. aeruginosa*.

5. BIBLIOGRAFÍA CITADA

Abarca, G. y Herrera, M. 2001. Betalactamasas: su importancia en la clínica y su detección en el laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*. 2(37): 1-10.

Abbas, H., El-Ganiny, A. y Kamel, H. 2018. Phenotypic and genotypic detection of antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urinary tract infections. *African Health Sciences*. 18(1): 11-21.

Abraham, E. y Chain, E. 1940. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*. 10(4): 837

Acar, J. 1985. Gram-Negative Aerobic Bacterial Infections: A Focus on Directed Therapy, with Special Reference to Aztreonam. *Reviews of Infectious Diseases*. 7:545-551.

Adesoji, A., Ogunjobi, A. y Olatoye, I. 2015. Molecular characterization of selected multidrug resistant *Pseudomonas* from water distribution systems in outhwestern Nigeria. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobial*. 14(39): 1-11.

Adewoye, L., Sutherland, A., Srikumar, R. y Poole, K. 2002. The MexR Repressor of the *mexAB-oprM* Multidrug Efflux Operon in *Pseudomonas aeruginosa*: Characterization of Mutations Compromising Activity. *Journal of Bacteriology*. 15(184): 4308–4312.

Akama, H., Matsuura, T., Kashiwagi, S., Yoneyama, H., Narita, S., Tsukihara, T., Nakagawa, A., y Nakae, T. (2004). Crystal Structure of the Membrane Fusion Protein, MexA, of the Multidrug Transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Biological Chemistry*. 25(279): 25939–25942.

Allydice, K. y Brown, P. 2012. Diversity of Antimicrobial Resistance and Virulence Determinants in *Pseudomonas aeruginosa* Associated with Fresh Vegetables. *International Journal of Microbiology*. 7: 1-7.

Alonso, A., Rojo, F., y Martínez, J. 1999. Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* show pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin. *Environmental Microbiology*. 5(1): 421–430.

ANÓNIMO. 2008. Prevención y control de la infección nosocomial. Servicio Madrileño de Salud, Ministerio de Salud y Consumismo de España. Madrid, España. Págs. 367.

Arabestani, M., Rajabpour, M., Mashouf, R., Alikhani, M. y Mousavi, S. 2015. Expression of Efflux Pump *MexAB-OprM* and *OprD* of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Clinical Samples using qRT-PCR. *Archives of Iranian Medicine*. 2(18): 102-108.

- Bahmani, N. y Ramazanzadeh, R. (2013). Detection of SHV type extended-spectrum β -lactamase and risk factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Pakistan Journal of Medical Science*. 29(3): 788-792).
- Barthélémy, M., Péduzzi, J. and Labia, R. 1985. Distinction entre les structures primaires des-lactamases TEM-1 et TEM-2. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol*. 136: 311–321.
- Bauernfeind, A., Stemplinger, I., Jungwirth, S., Ernst y Casellas, J. 1996. Sequences of β -lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother*. 40:509–513.
- Blanco, M. 2006. Infecciones hospitalarias, Cap. 15. En: Temas de Bacteriología y Virología Médica. Universidad de la República. Uruguay. 2006. 2da edición. págs. 245-254.
- Bodilis, J., Ghysels, B., Osayande, J., Matthijs, S., Pirnay, J., Denayer, S., De Vos, D. Cornelis, P. 2009. Distribution and evolution of ferripyoverdine receptors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*. 11(8): 2123–2135.
- Bokaeian, M., Shahraki S., Soltanian, M. y Ansari, A. 2015. Frequency of *PER*, *VEB*, *SHV*, *TEM* and *CTX-M* Genes in Resistant Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Producing Extended Spectrum β -Lactamases. *Jundishapur J Microbiol*. 8(1): 1-6.
- Bonnet, R., Champs, C., Sirot, D., Chanal, C., Labia, R. y Sirot, J. 1999. Diversity of TEM mutants in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 43:2671–2677.
- Bonomo, R. y Szabo, D. 2006. Mechanism of Multidrug resistance in *Acinetobacter species P. aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases*. 2(43): 49-56.
- Bradford, P. 2001. Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*. 4(14): 933–951.
- Casellas J. 2011. Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. *Rev Panam Salud Publica*. 30(6): 519–28.
- Chen, W. y Kuo, T. 1993. A simple and rapid method for the preparation of gramnegative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Research*. 9(21): 2260.
- Chen, J., Su, Z., Liu, Y., Wang, S., Dai, X., Li, Y., Peng, S., Shao, Q., Zhang, H., Wen, P., Yu, J., Huang, X. y Xu, H. 2009. Identification and characterization of class 1 integrons among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in Zhenjiang, China. *International Journal of Infectious Diseases*. 13: 717—721.
- Cornelis, P. y Dingemans, J. 2013. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron up take strategies infuction of the type of infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 3(75): 1-7.

Cornelis, P. y Matthijs, S. 2002. Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdines. *Environmental Microbiology*. 4(12): 787-798.

Cornelis, P., Hohnadel, D. y Meyer, J. 1989. Evidence for Different Pyoverdine-Mediated Iron Uptake Systems among *Pseudomonas aeruginosa* Strains. *Infection Immunity*. 11(57): 3491-3497.

Denayer, S., Matthijs, S. y Cornelis, P. 2007. Pyocin S2 (Sa) Kills *Pseudomonas aeruginosa* Strains via the FpvA Type I Ferripyoverdine Receptor. *Journal of Bacteriology*. 21(189): 7663–7668.

de Chial, M., Ghysels, B., Beatson, S., Geoffroy, V., Meyer, J., Pattery, T., Baysse, C., Chablain, P., Parsons, Y., Winstanley, C., Cordwell, S. y Cornelis, P. 2003. Identification of type II and type III pyoverdine receptors from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. 149: 821–831.

De Vos, D., Lim, A., Pirnay, J., Struelens, M., Vandenvelde, C., Duinslaeger, L., Vanderkelen, A. y Cornelis, P. 1997. Direct Detection and Identification of *Pseudomonas aeruginosa* in Clinical Samples Such as Skin Biopsy Specimens and Expectorations by Multiplex PCR Based on Two Outer Membrane Lipoprotein Genes, oprI and oprL. *Journal of Clinical Microbiology*. 6(35): 1295-1299.

De Vos, D., de Chial, M., Cochez, C., Jansen, S., Tummler, B., Meyer, J y Cornelis, P. 2001. Study of pyoverdine type and production by *P. aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis: prevalence of type II pyoverdine isolates and accumulation of pyoverdine negative mutations. *Arch. Microbiol.* 175: 384-388.

Díaz, Y., Núñez, J., de Mayorga, B., Jaramillo, F., Chen, O., de Paredes, M. y de Chial, M. 2012. Epidemiología molecular de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en el Complejo Metropolitano Harmodio Arias Madrid. *Tecnociencia*. 2(14): 23-38.

Dumas, J., van Delden, C., Perron, K. y Kohler, T. 2005. Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. *Federation of European Microbiological Societies*. 254: 217-225.

Ezraty, B. y Barras, F. 2016. The 'liaisons dangereuses' between iron and antibiotics. *Federation of European Microbiological Societies*. 40: 418-435.

Girlich, D., Naas, T., Leelaporn, A., Poirel, L., Fennwald, M. y Nordmann, P. 2002. Nosocomial Spread of the Integron-Located *veb-1*-Like Cassette Encoding an Extended-Spectrum β -Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand. *Clinical Infectious Diseases*. 34: 603–611.

Ghadbman, I., Al-Absali, A., Hashim, N. y Abdul-Latif, S. 2012. Occurrence of MexAB-OprM Efflux Pump Operon on Septicemic *Pseudomonas aeruginosa* Chromosome. *Iraqi Postgraduate Medical Journal*. 1(11): 97-102.

Ghuysen, J. 1991. Serine β -lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* 45:37–67.

Guan, L., Ehrmann, M., Yoneyama, H. y Nakae, T. (1999). Membrane Topology of the Xenobiotic-exporting Subunit, MexB, of the MexA,B-OprM Extrusion Pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Biological Chemistry*. 15(274): 10517–10522.

Hancock, R. 1998. Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and Other Nonfermentative Gram-Negative Bacteria. *Clinical Infectious Diseases*. 27: 93-99.

Health Canada. An integrated protocol to manage health care workers exposed to bloodborne pathogens. *Can Commun Dis Rep*. 1997a. 23 Suppl 2: 1–16.

Health Canada. Preventing the transmission of bloodborne pathogens in health care and public services. *Can Commun Dis Rep*, 1997b. 23 Suppl 3: 1–52.

Hernández, M., Castillo, G., Ciniglio, C., Ramos, C., Chen, O., de Mayorga, B., Duran, O., González, E., Aguilar, C., Cisterna, O. y de Chial, M. 2016. Molecular Characterization Of *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates Among Patients Of The Hospital Del Niño, Republic Of Panama. *Internet Journal of Microbiology*. 1(14): 1-9.

Inglis, F., Scanlan, P. y Buckling, A. (2016). Iron availability shapes the evolution of bacteriocin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *The ISME Journal*. 10: 2060–2066.

Ishii, Y., Ohno, A., Taguchi, S., Imajo, M., Ishiguro y H. Matsuzawa. 1995. Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A β -lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:2269–2275.

Jafari, M., Dolatabadi, S. y Reza, H. 2017. Detection of Efflux MexAB-associated Multidrug Resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Patients in Torbat Heydarie, Northeast Iran. *Archives of Medical Laboratory Sciences*. 3(3): 1-8.

Jiang, X., Zhang, Z., Li, M., Zhou, D., Ruan, F. y Lu, Y. 2006. Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 9(50): 2990–2995.

Kaur, M. y Aggarwal, A. 2013. Occurrence of the CTX-M, SHV and the TEM Genes Among the Extended Spectrum β -Lactamase Producing Isolates of Enterobacteriaceae in a Tertiary Care Hospital of North India. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 4(7): 642-645.

Kohler, T., Kok, M., Michea-Hamzehpour, M., Plesiat, P., Gotoh, N., Nishino, T., Curty, L., y Pechere, J. 1996. Multidrug Efflux in Intrinsic Resistance to Trimethoprim and Sulfamethoxazole in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 10(40): 2288–2290.

Kriengkauykiat, J., Porter, E., Lomovskaya, O. y Wong-Beringer, A. 2005. Use of an Efflux Pump Inhibitor To Determine the Prevalence of Efflux Pump-Mediated

Fluoroquinolone Resistance and Multidrug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:565-70.

Lamont, I., Beare, P., Ochsner, U., Vasil, A. y Vasil, M. 2002. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 10(99): 7072-7077.

Livermore, D. M. 1995. Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 8:557–584.

Lister, P., Wolter, D. y Hanson, N. 2009. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews.* 4(22): 582-610.

Litwin, C. y Calderwood, S. 1993. Role of Iron in Regulation of Virulence Genes. *Clinical Microbiology Reviews.* 2(6): 137-149.

Livermore, D. 1995. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 8:557–584.

Luján, D., Ibarra, J. y Mamani, E. 2008. Resistencia a los antibióticos en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en un hospital universitario en Lima, Perú. *Revista Biomédica.* 19: 156-160.

Luna, P., Rodrigues, L., Borges, A., Souza, A. y Vieira, M. 2012. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, State of Pernambuco, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 6(45): 707-712.

Lyczak, J.; Cannon, C. y Pier, G. 2002. Lung Infections Associated with Cystic Fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews.* 2(15): 194–222.

Medeiros, A. 1984. β -Lactamases. *Br. Med. Bull.* 40:18–27.

Meyer, J., Stintzi, A., De Vos, D., Cornelis, P., Tappe, R., Taraz, K. y Budzikiewicz, H. 1997. Use of siderophores to type pseudomonads: the three *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine systems. *Microbiology.* 143: 35-43.

Morejón, M. 2013. Betalactamasas de espectro extendido. *Revista Cubana de Medicina.* 52(4): 272-280.

Morgan, J., Bellingham, N., Winstanley, C., Ousley, M., Hart, C. y Saunders, J. 1999. Comparison of Flagellin Genes from Clinical and Environmental *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. *Applied and Environmental Microbiology.* 3(65): 1175–1179.

Oglesby, A., Djapgne, L., Nguyen, A., Vasil, A. y Vasil, M. 2014. The complex interplay of iron, biofilm formation, and mucoidy affecting antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathogen and Disease.* 70: 307-320.

Olaechea, P., Insausti, J., Blanco, A. y Luque, P. 2010. Epidemiology and impact of nosocomial infections. *Med Intensiva*. 34: 256–67.

Olaechea, P., Insausti, J., Blanco, A. y Luque, P. 2010. Epidemiología e impacto de las infecciones nosocomiales. *Med Intensiva*. 34(4): 256–267.

Organización Mundial de la Salud (a). Farmacoresistencia.
<http://www.who.int/drugresistance/es/>

Organización Mundial de la Salud (b). Aparición y propagación de la resistencia a los antimicrobianos. El origen de la resistencia a los antimicrobianos.
http://www.who.int/drugresistance/AMR_Emergence_Spread/es/

Organización Mundial de la Salud. 2003. Guía Práctica Ed. 2: Prevención de las Infecciones Nosocomiales.

Pereira, S., Rosa, A. y Cardoso, O. 2015. Virulence factors as predictive tools for drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Virulence*. 6(7): 679-83.

Pirnay, J., De Vos, D., Mossialos, D., Vanderkelen, A., Cornelis, P. y Zizi, M. 2002. Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* oprD gene from clinical and environmental isolates. *Environmental Microbiology*, 12(4): 872–882.

Poole, K., Tetro, K., Zhao, Q., Neshat, S., Heinrichs, D. y Bianco, N. 1996. Expression of the Multidrug Resistance Operon *mexA-mexBoprM* in *Pseudomonas aeruginosa*: *mexR* Encodes a Regulator of Operon Expression. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 9(40): 2021–2028.

Poole, K. 2001. Multidrug Efflux Pumps and Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and Related Organisms. *Journl of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2(3): 255-264.

Pozuelo, M., Jiménez, P., Valderrey, A., Fernández, A., Cantón, R. y Rotger, R. 2011. Polimorfismo de los genes *mucA* y *fpvA* en *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes con fibrosis quística: coexistencia de variantes genéticas en el mismo paciente. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 1(29): 26-31.

Romling, U., Wingender, J., Muller, H. y Tummeler, B. 1994. A Major *Pseudomonas aeruginosa* Clone Common to Patients and Aquatic Habitats. *Applied and Environmental Microbiology*. 6(60): 1734-1738.

Sánchez, D. 2008. Factores relacionados con la incidencia de infecciones nosocomiales según las enfermeras que labran en la Unidad de Cuidados Intensivos del Instituto Oncológico Nacional. Tesis. Ciudad de Panamá: Universidad de Panamá, Facultad de Enfermería. 131 págs.

Santella, G.; Pollini, S.; Docquier, J.; Almuzara, M.; Gutkind, G.; Rossolini, G. y Radice, M. 2011. Resistencia a carbapenemes en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*: un

ejemplo de interacción entre distintos mecanismos. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 6(30): 545-548.

Sato, K., Ushioda, K., Akiba, K., Matsumoto, Y., Maseda, H., Ando, T., Isogai, E., Nakae, T. y Yoneyama, H. 2015. Development of a Novel Antimicrobial Screening System Targeting the Pyoverdine-Mediated Iron Acquisition System and Xenobiotic Efflux Pumps. *Molecules*. 20: 7790-7806.

Senda, K., Arakawa, Y., Nakashima, K., Ito, H., Ichiyama, S., Shimokata, K., Kato, N. y Ohta, M. 1995. Multifocal Outbreaks of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Resistant to Broad-Spectrum β -Lactams, including Carbapenems. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2(40): 349-353.

Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Danish, S. y Amjad, M. 2015. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 22: 90–101.

Shakibaie, M., Shahcheraghi, F., Hashemi, A. y Adeli, N. 2008. Detection of TEM, SHV and PER Type Stended-Spectrum β -lactamase Genes among Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Burnt Patients of Shafa-Hospital, Kerman, Iran. *Iranian Journal of Basics Medical Sciences*. 2(11): 104-111.

Smet, A., Martel, A., Persoons, D., Dewulf, J., Heyndrickx, M., Herman, L., Haesebrouck, F. y Butaye, P. 2009. Broad-spectrum β -lactamases among *Enterobacteriaceae* of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health. *FEMS Microbiology Reviews*. 34: 295-316.

Spangenberg, C., Fislage, R., Sierralta, W., Tümmeler, B., y Römling, U. 1995. Comparison of type IV-pilin genes of *Pseudomonas aeruginosa* of various habitats has uncovered a novel unusual sequence. *FEMS Microbiology Letters*. 1-2(127): 158-168.

Speert, D., Campbell, M., Henry, D., Milner, R., Taha, F., Gravelle, A., Davidson, A., Wong, L. y Mahenthiralingam, E. 2002. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis in British Columbia, Canada. *Am J Respir Crit Care Med*. 166: 988–993.

Srikumar, R., Paul, C. y Poole, K. 2000. Influence of Mutations in the *mexR* Repressor Gene on Expression of the MexA-MexB-OprM Multidrug Efflux System of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 5(182): 1410–1414.

Stehling, E., Leite, D. y Silveira, W. 2010. Molecular typing and biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients in Brazil. *Braz J Infect Dis*. 14(5): 462-467.

Strateva, T. y Yordanov, D. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*. 58: 1133–1148.

Tzouveleakis, L., Tzelepi, E., Tassios, P. y Legakis, N. 2000. CTX-M type β -lactamases: an emerging group of extended- spectrum enzymes. *Int J Antimicrob Agents*. 14:137-142.

Villa, L., Cortés, J., Leal, A., Meneses, A. y Meléndez, M. 2013. *Pseudomonas aeruginosa* resistente a antimicrobianos en hospitales colombianos. *Microbiología*. 6(30): 605-610.

Yayan, J.; Ghebremedhin, B. y Rasche, K. 2015. Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in Pneumonia at a Single University Hospital Center in Germany over a 10-Year Period. *PLoS ONE*. 10(10): 1-20.

Yoneyama, H., Tsuda, M., Nakae, T. 1997. The role of mex-gene products in antibiotic extrusion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun*. 233(3): 611 – 618.

Zaragoza, R., Ramírez, P. y López-Pueyo, M. 2014. Infección nosocomial en las unidades de cuidados intensivos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 32(5): 320–327.

Referencias web

<http://www.pseudomonas.com/feature/show?id=103591>

<http://www.pseudomonas.com/feature/show/?id=107576&view=expression>

ANEXO

PREPARACIÓN DE MEDIOS

1. Preparación de medio Luria Bertani (LB) agar

Esta preparación es para 500 ml de medio LB agar:

Tryptona	5 g
Extracto de levadura	2.5 g
NaCl	5 g
Agar	7.5 g

Se mezcla con agitación y calor y luego se procede a autoclavar a 120°C por 15 min. Se deja enfriar y se sirven 25 ml de medio en cada plato Petri.

2. Preparación de medio Luria Bertani (LB) caldo

Esta preparación es para 500 ml de medio LB caldo:

Tryptona	5 g
Extracto de levadura	2.5 g
NaCl	5 g

Se mezcla con agitación y calor y luego se procede a autoclavar a 120°C por 15 min. Se deja enfriar.

3. Preparación de medio Casamino acid agar (CAA)

Esta preparación es para 500 ml de medio CAA agar:

CAA	2.5 g	
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O		0.77 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O		0.125 g
Agar	7.5 g	

Se mezcla con agitación y calor y luego se procede a autoclavar a 120°C por 15 min. Se deja enfriar y se sirven 25 ml de medio en cada plato Petri.

4. Preparación de medio Casamino acid (CAA) caldo

Esta preparación es para 500 ml de medio CAA:

CAA	2.5 g	
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O		0.77 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O		0.125 g

Se mezcla con agitación y calor y luego se procede a autoclavar a 120°C por 15 min. Se deja enfriar.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

1. Preparación de tampón Tris-acetato pH= 7.8

Para la preparación de 100 ml se pesaron 12.1 g de Trizma base y se diluyeron en 75 ml de agua desionizada y se ajustó pH con ácido acético glacial concentrado hasta alcanzar pH de 7.8. Una vez alcanzado el pH requerido se ajustó hasta 100 ml con agua desionizada.

2. Preparación de gel de agarosa 0.8%

- a. Para la preparación de un gel de 50 ml se mezcló:

Agarosa grado biología molecular	0.4 g
Tampón TAE 1X	50 ml

- b. Luego se procedió a mezclar utilizando un agitador con temperatura hasta que esté totalmente disuelto.
- c. Se dejó enfriar y se añadió 3 gotas de GelRed como agente intercalante y de tinción
- d. Se coloca el peine en la cámara de gel y se sirve el gel en la cámara hasta gelificar.

3. Preparación de gel de agarosa 1%

- a. Para la preparación de un gel de 50 ml se mezcló:

Agarosa grado biología molecular	0.5 g
Tampón TAE 1X	50 ml

- b. Luego se procedió a mezclar utilizando un agitador con temperatura hasta que esté totalmente disuelto.
- c. Se dejó enfriar y se añadió 3 gotas de GelRed como agente intercalante y de tinción
- d. Se coloca el peine en la cámara de gel y se sirve el gel en la cámara hasta gelificar.

4. Preparación de cebadores

La preparación de los cebadores a partir de cebadores liofilizados se llevó a 100 μ M con las cantidades de agua ultra pura, tal cual lo indicó el manual de instrucciones de la empresa proveedora Integrated DNA Technologies.

Genes	100 μM (μL de H₂O)	100 μM (μL de H₂O)
<i>MexR</i>	309	279
<i>MexA</i>	377	328
<i>MexB</i>	21	267
<i>OprM</i>	302	293
<i>SHV</i>	304	312
<i>CTX</i>	300	319
<i>TEM</i>	296	364
<i>FpvI</i>	233	262
<i>FpvII</i>	293	336
<i>FpvIII</i>	262	233

Luego todos se llevaron a solución de trabajo de 10 μ M, mezclando 10 μ L de cebador y 90 μ L de H₂O ultra pura.

SECUENCIAS DE CEBADORES UTILIZADOS

Genes	Forward	Reverse	Producto esperado (pb)
<i>MexR</i>	5'-GAACTACCCCGTGAATCC-3'	5'-CACTGGTCGAGGAGATGC-3'	411
<i>MexA</i>	5'-CTCGACCCGATCTACGTC-3'	5'-GTCTTCACCTCGACACCC-3'	503
<i>MexB</i>	5'-TGTCGAAGTTTTTCATTGATAG-3'	5'-AAGGTCACGGTGATGGT-3'	280
<i>SHV</i>	5'-GCGAAAGCCAGCTGTCGGGGC-3'	5'-GATTGGCGGCGCTGTTATCGC-3'	538
<i>CTX</i>	5'-GTGCAGTACCAGTAAAGTTATGG-3'	5'-CGCAATATCATTGGTGGTGCC-3'	538
<i>TEM</i>	5'-AAAGATGCTGAAGATCA-3'	5'-TTTGGTATGGCTTCATTC-3'	425
<i>Fpval</i>	5'-CGAAGGCCACAACACTACGAGA-3'	5'-TG TAGCTGGTGTAGAGGCTCAA-3'	326
<i>Fpvall</i>	5'-TACCTCGACGGCCTGCACAT-3'	5'-GAAGGTGAATGGCTTGCCGTA-3'	897
<i>Fpvalll</i>	5'-ACTGGGACAAGATCCAAGAGAC-3'	5'-CTGGTAGGACGAAATGCGAG-3'	506